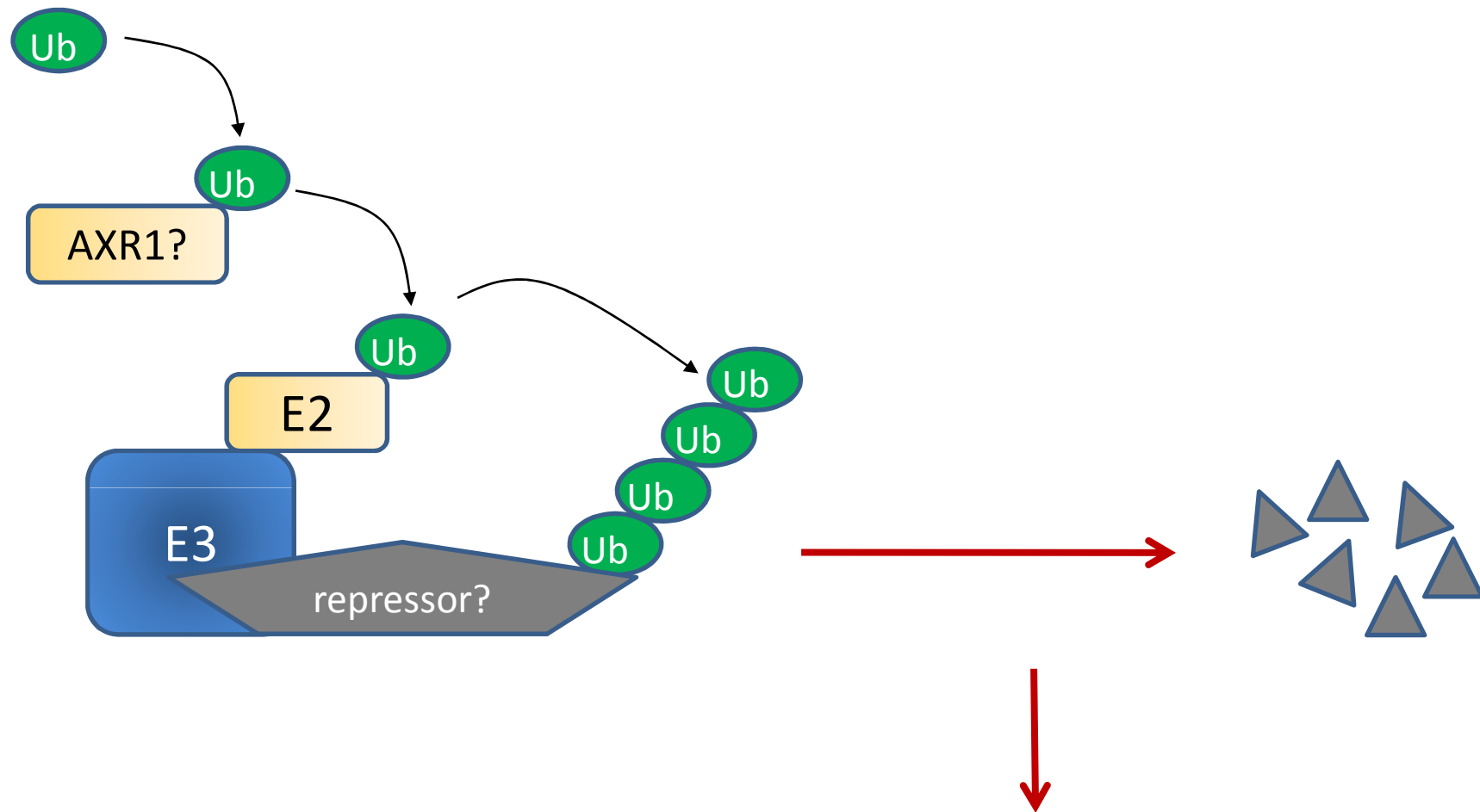


2. Seminar: 29.04.2009

1. Ballas *et al.* (1993): Identification of the Auxin-responsive Element, AuxRE, in the Primary indoleacetic Acid-inducible Gene, *PS-IAA4/5*, of Pea (*Pisum sativum*). J Mol Biol **233**: 580- 596
2. Ulmasov *et al.* (1997): ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. Science **276**: 1865-1868

preliminary model (1993)



AXR1 similar to ubiquitin-activating enzyme E1

auxin response

Hintergründe

bis dahin bekannt (1993):

- schnelle Induktion der Zellelongation durch Auxin (~15-25 min)
- transkriptionelle Induktion verschiedener Gene geht der phys. Reaktion voraus.
- Hypothese: Auxin reguliert Zellelongation über Veränderung von Genexpressionsmustern
- Auxin-responsive Gene wurden in Erbse, Sojabohne und Arabidopsis identifiziert, die untereinander eine sehr hohe Homologie aufweisen und Kriterien als primäre Auxin-responsegene erfüllen:
 - Induktion der Expression schnell und spezifisch durch Auxin
 - Induktion erfordert keine *de novo* Proteinbiosynthese
 - erforderliche Signalelemente liegen bereits vor

1. paper

J. Mol. Biol. (1993) 233, 580–596

**Identification of the Auxin-responsive Element, *AuxRE*, in the
Primary indoleacetic Acid-inducible Gene, *PS-IAA4/5*, of Pea
(*Pisum sativum*)**

Nurit Ballas†, Lu-Min Wong† and Athanasios Theologis‡

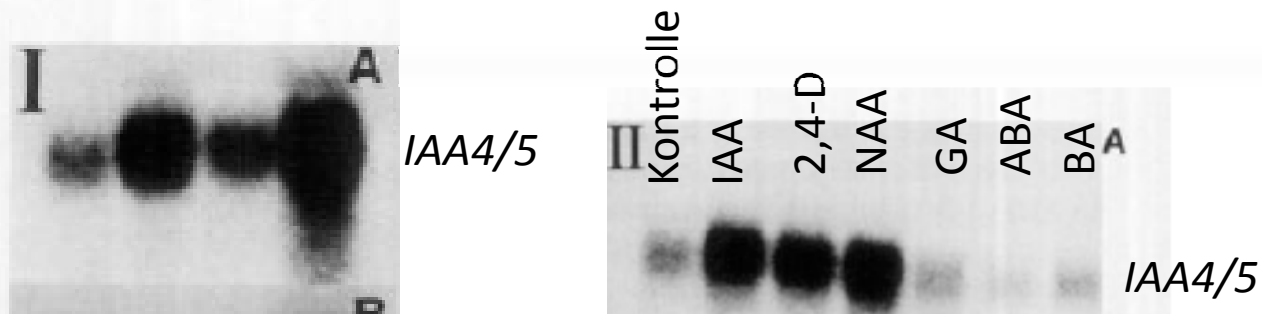
Ziel: Identifizierung der Promotorsequenz, die für die Auxin
response in Auxin-induzierbaren Genen verantwortlich ist =
Auxin Response Element (AuxRE)

= Versuchen den Signalweg vom Ende her zu entschlüsseln
(erst die Promotorsequenz, dann Transkriptionsfaktoren, Interaktionsproteine der
Transkriptionsfaktoren.....)

Voraussetzung:

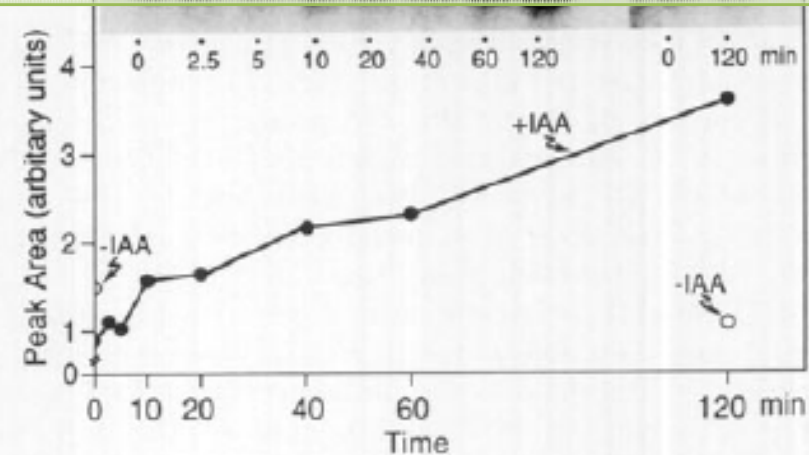
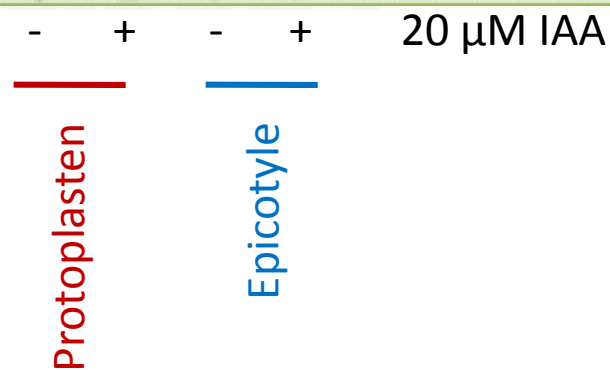
- Etablierung eines Auxin-induzierbaren Protoplastensystems / Reportersystems
 - Lokalisation des AuxRE erfordert das Testen vieler verschiedener (chimärer) Konstrukte
 - stabile Trafo (sehr aufwändig + zeitintensiv + funktioniert nicht mit jeder Pflanzenart gleich gut)
 - transiente Transfektion mit Protoplasten (leichter zugänglich für die Aufnahme von DNA-Konstrukten und Chemikalien als komplexe Gewebe)
- Notwendiger Test:
Überprüfen ob sich die Protoplasten genauso verhalten wie intakte Keimlinge (Auxin response)

test protoplasts vs. epicotyls



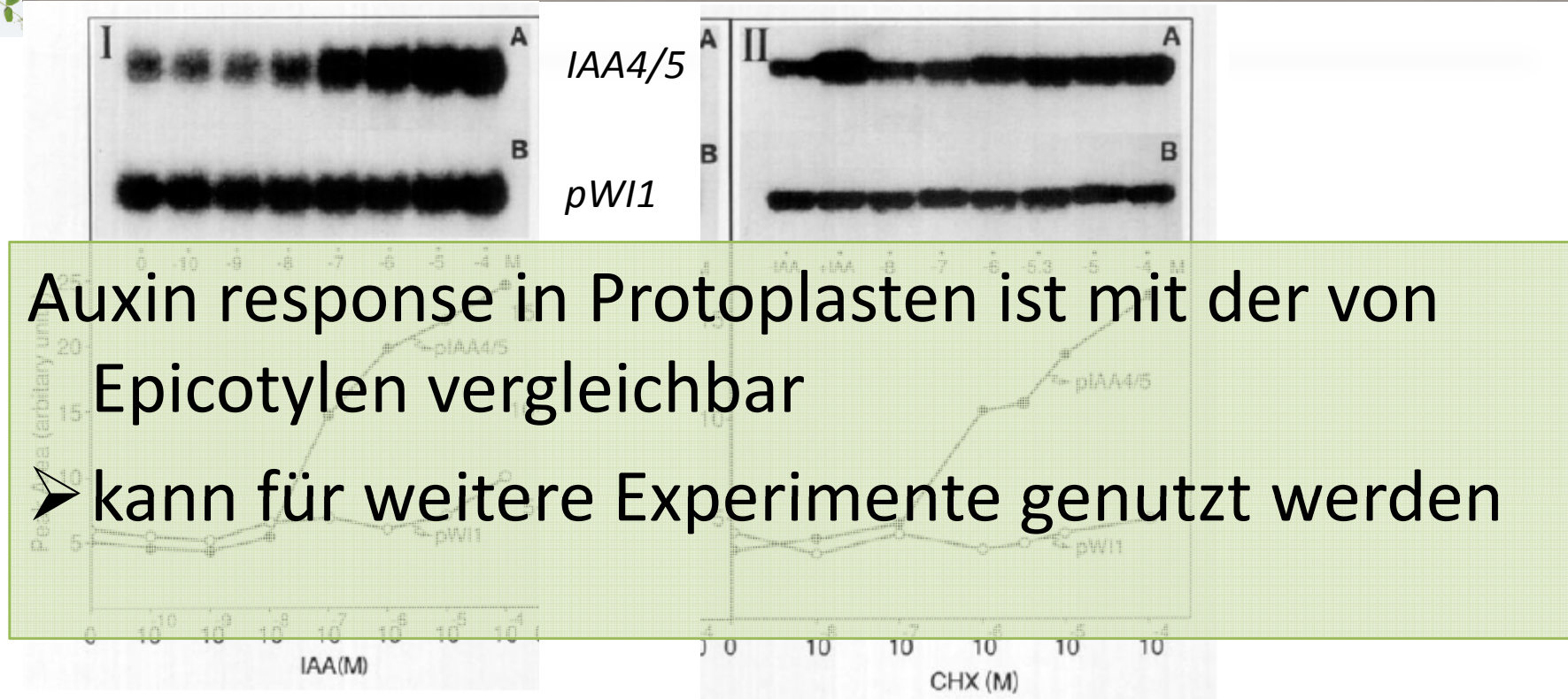
IAA4/5 Induktion in Protoplasten

- gleicht der in Epicotylen
- wird spezifisch durch Auxine induziert
- erfolgt schnell, Transkriptmenge akkumuliert in Abhäng. der Behandlungsdauer





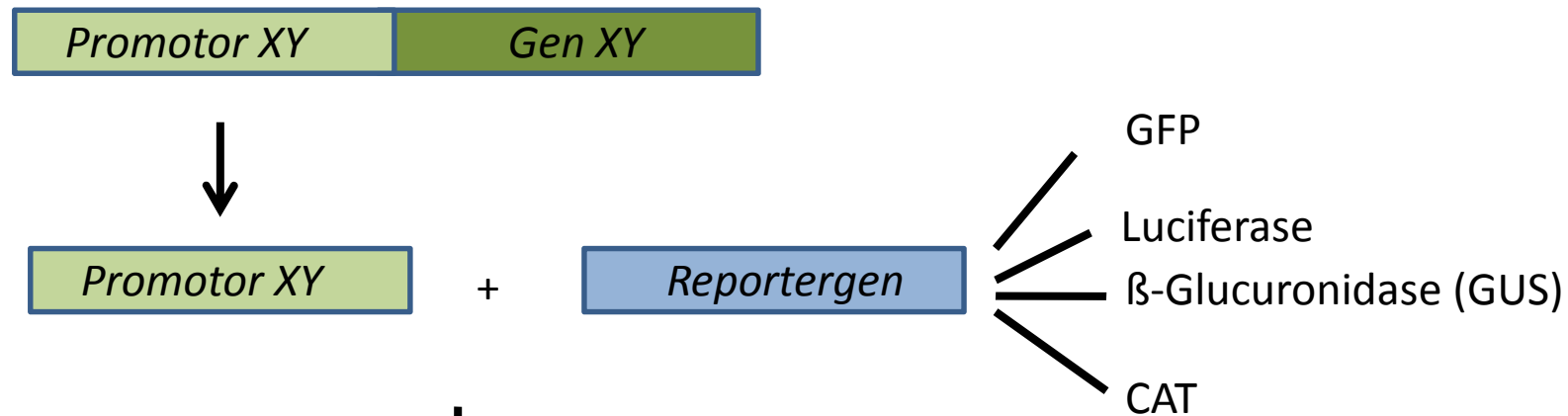
Konz. abhängigkeit



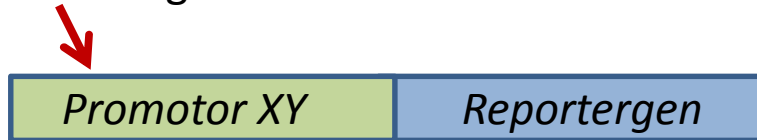
IAA4/5 Expression

- nimm mit steigender Auxinkonz. zu
 - Inhibierung der Proteinbiosynthese aktiviert Expression auch in Abwesenheit von Auxin!
1. Signalelemente müssen nicht erst gebildet werden
 2. fehlende Aktivierung im Grundzustand vermutlich durch Repressorproteine

Transkriptionelle Fusion (chimäre Konstrukte)



Aktivierung



Nachweis der mRNA

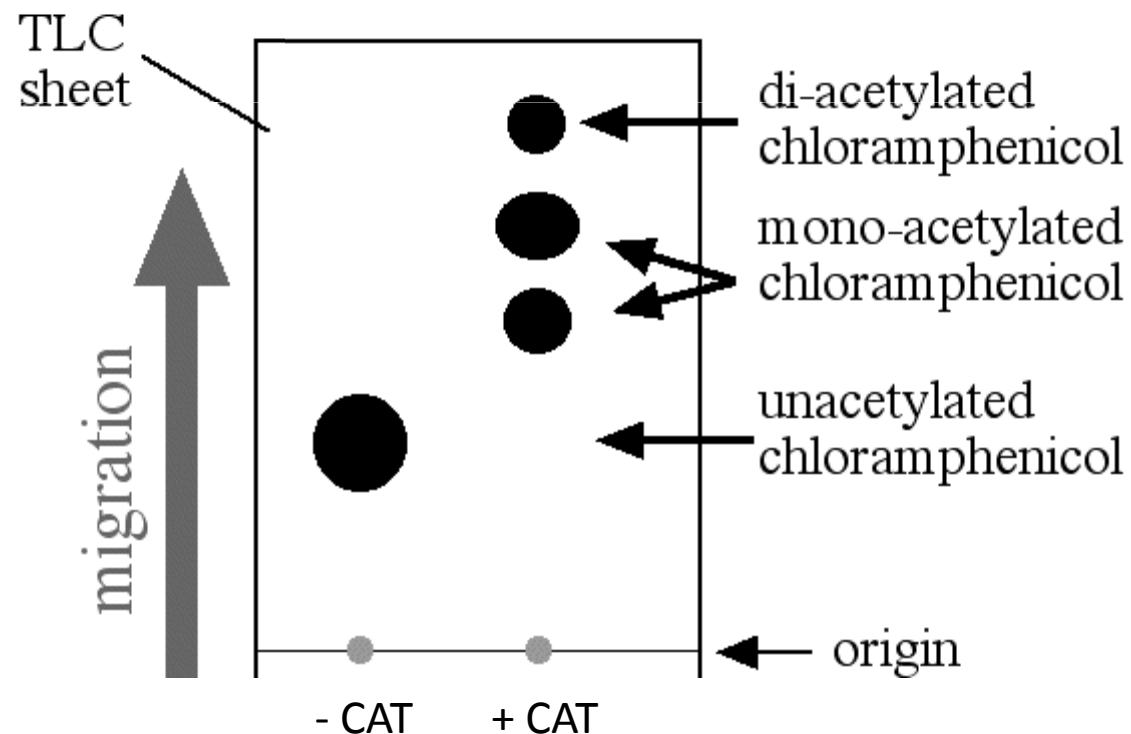


Nachweis der Proteinaktivität

CAT reporter system

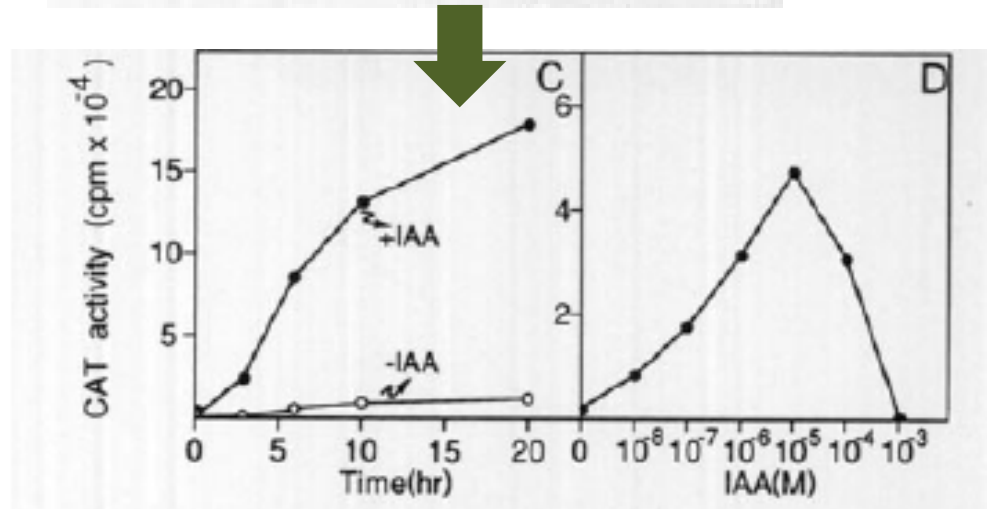
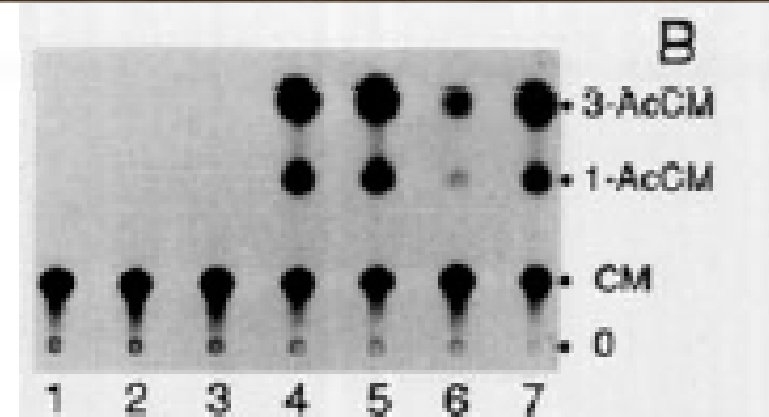
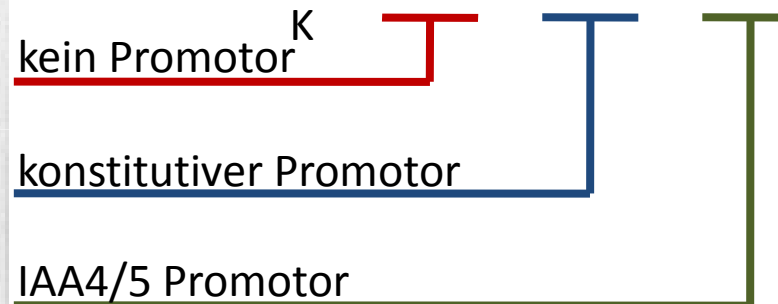
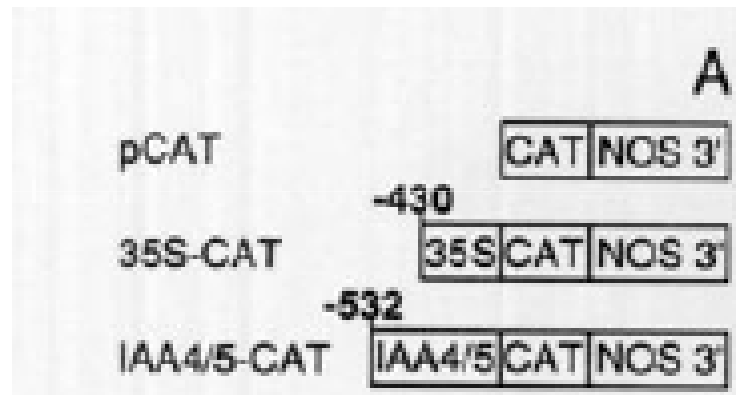
CAT = Chloramphenicol acetyltransferase

Enzym kann das Antibiotikum Chloramphenicol neutralisieren, indem Acetylgruppen übertragen werden



CAT reporter system

Test des CAT reporter systems

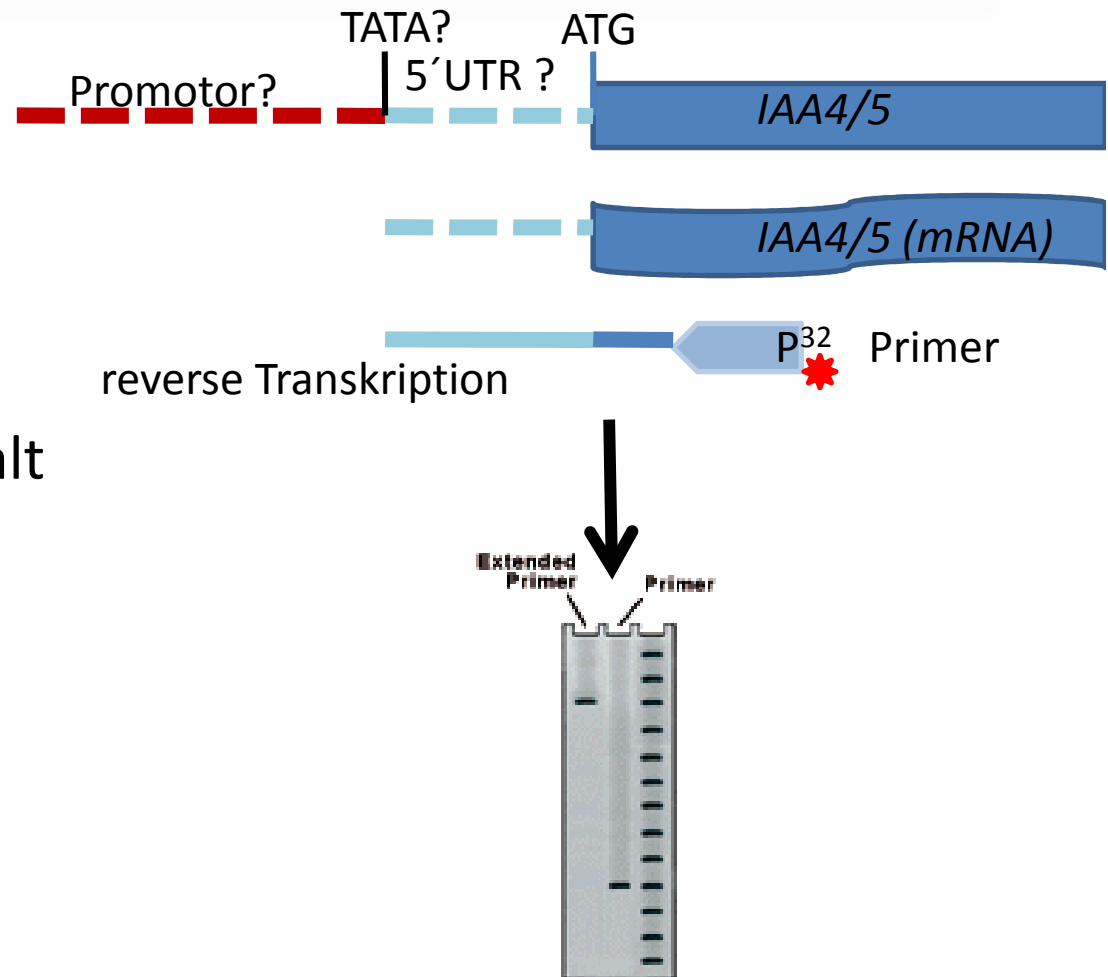


IAA4/5::CAT:
CAT-Aktivität spiegelt die Auxin
response des Promotors zeit- und
konzentrationsabhängig wider

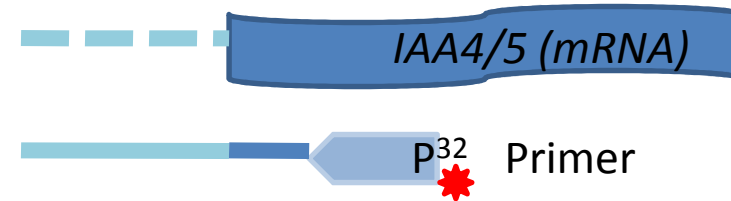
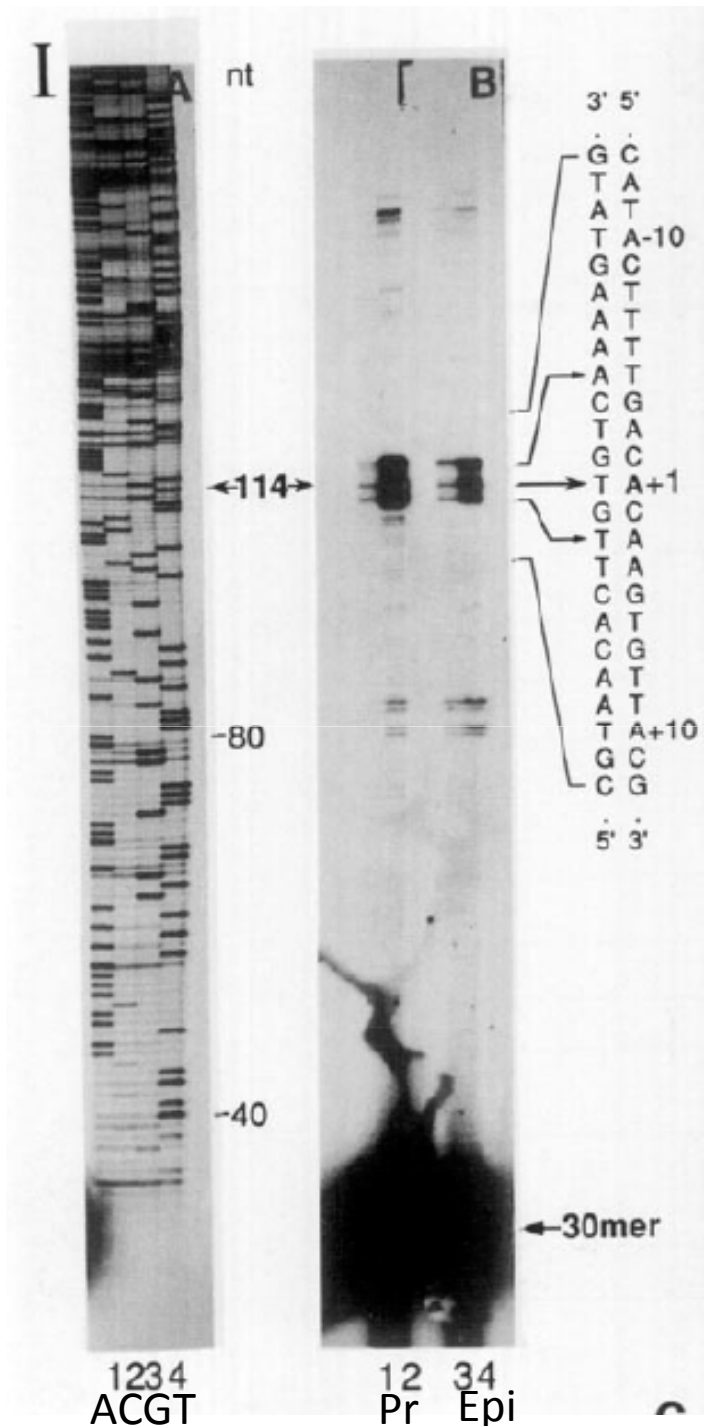
Aufklärung der Promotorstruktur

primer extension:

- i.d.R. erster Schritt zur Charakterisierung von Promotorbereichen/Erhalt vollständiger Transkripte
- Identifizierung des Transkriptionsstarts (TATA box, 5' UTR)



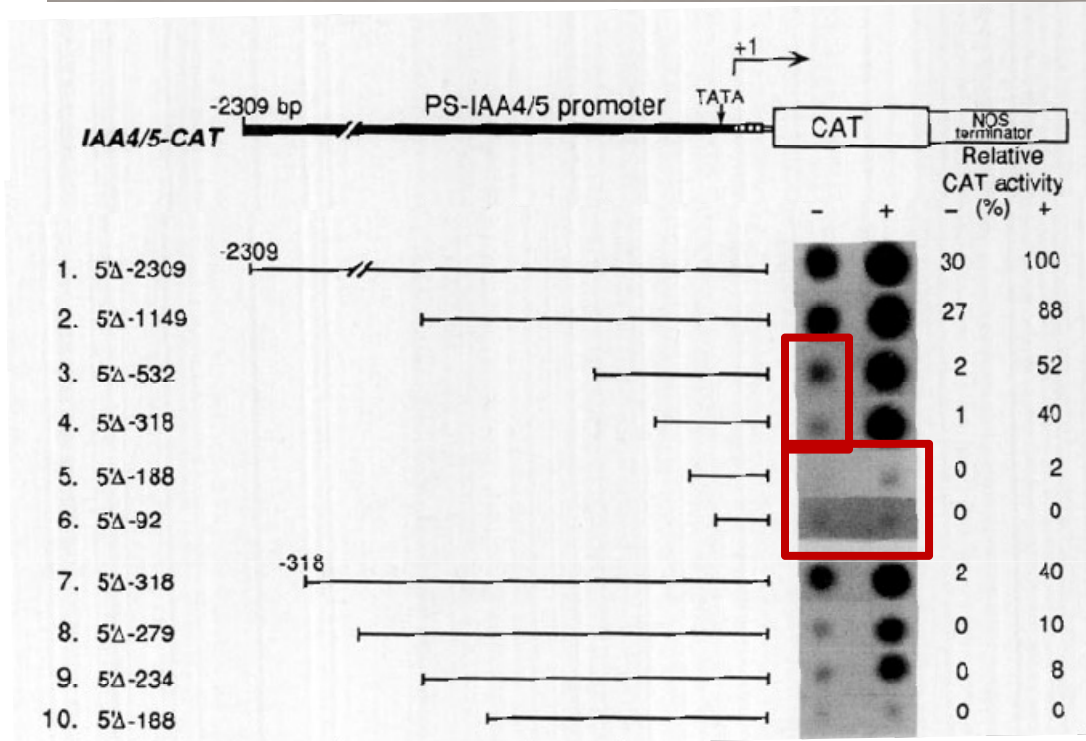
Primer extension



3 Transkriptionsstarts
identifiziert:
93, 95 und 99 bp vor dem
Start ATG

Experiment wurde auch mit Primer
Extension aus dem chimären Konstrukt
(*IAA4/5:CAT*) wiederholt = gleiches
Ergebnis

promoter deletion analysis



basale CAT Aktivität
vermindert - aber Auxin
response funktioniert noch

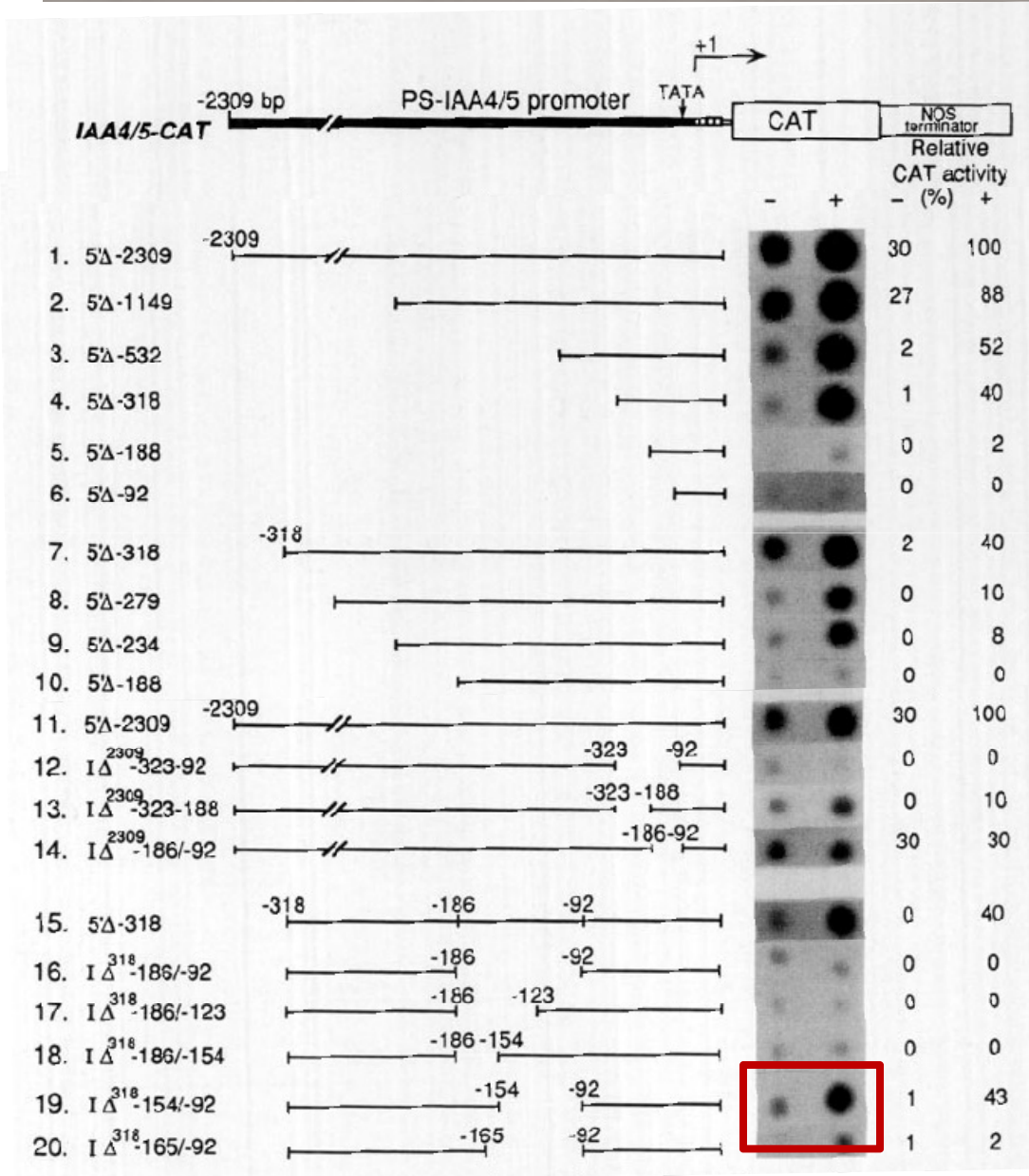
keine/kaum CAT Aktivität

CAT Aktivität



Vom 5'Ende her markiert Position -318 die Grenze zur Position des AuxRE

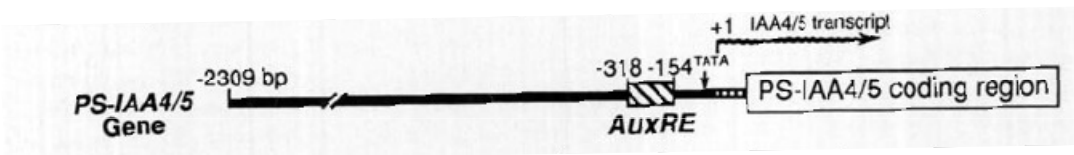
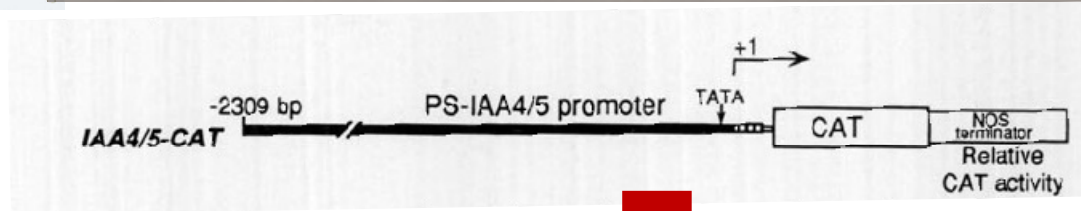
promoter deletion analysis



← -154 markiert 3'Ende des AuxRE

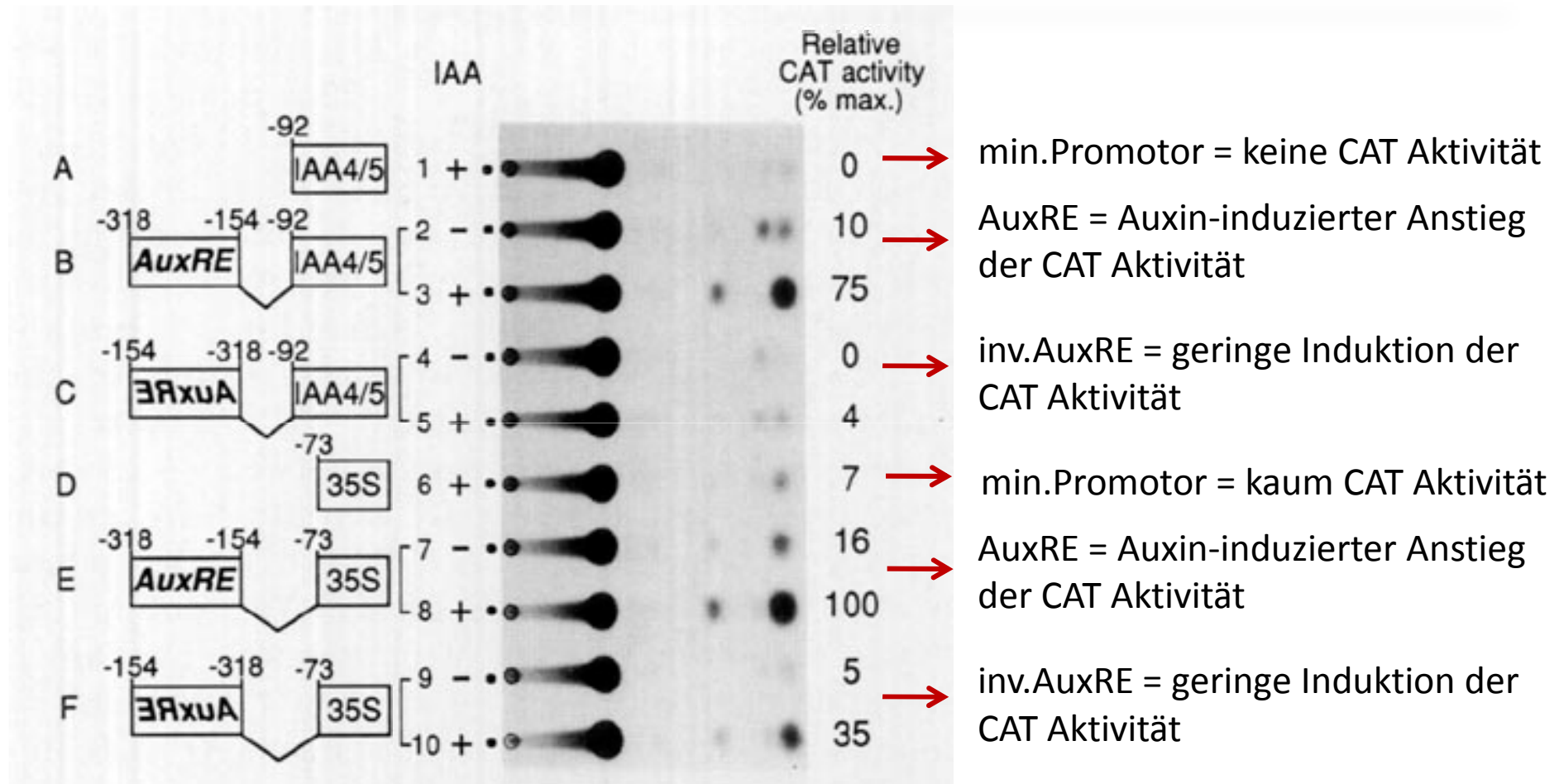


promoter deletion analysis



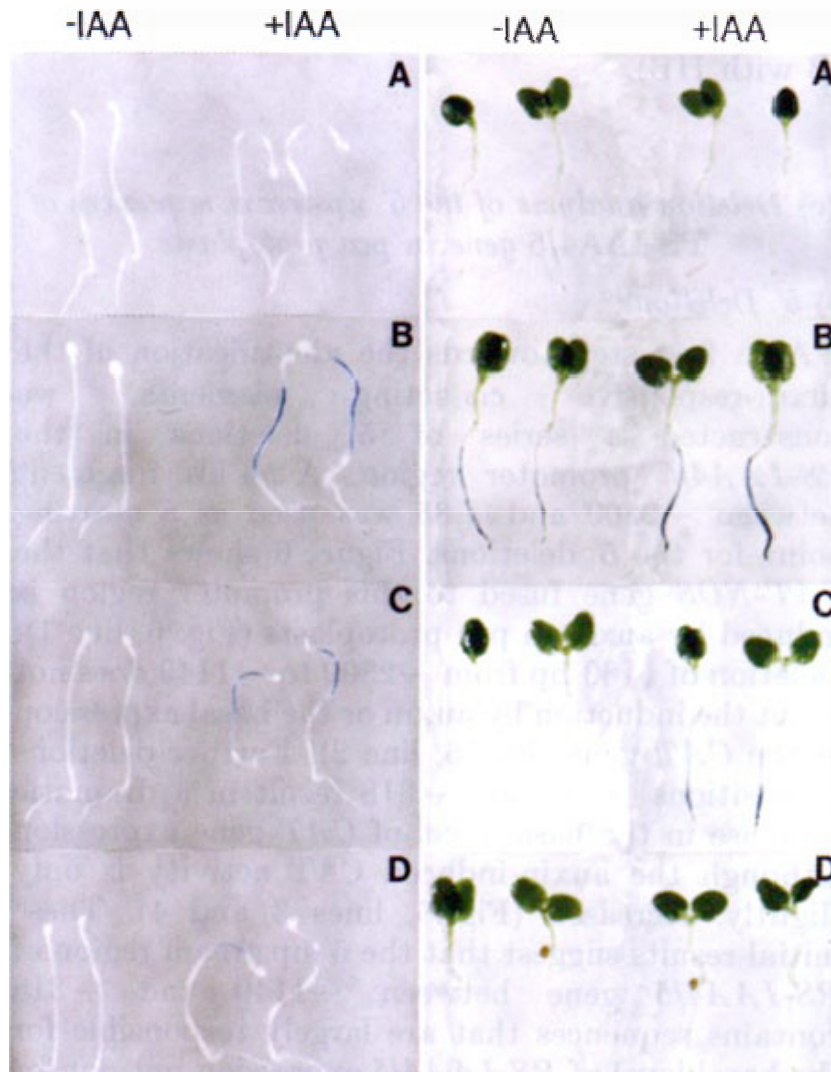
Das AuxRE liegt im Bereich von -154 bis -318

Testen der “core” sequence



(-318 AuxRE -154) reicht für die Auxin response aus – korrekte Orientierung ist essentiell!

in vivo reporter assay



Konstrukte in Tabak transformiert

GUS

-2309

IAA4/5 Promotor

GUS

-318

IAA4/5 Prom.

GUS

-188

IAA4/5

GUS

Bestätigung der Region -318 bis -154 als notwendig für die Auxin response
+ Faktoren die dafür in Erbse nötig sind finden sich auch in Tabak

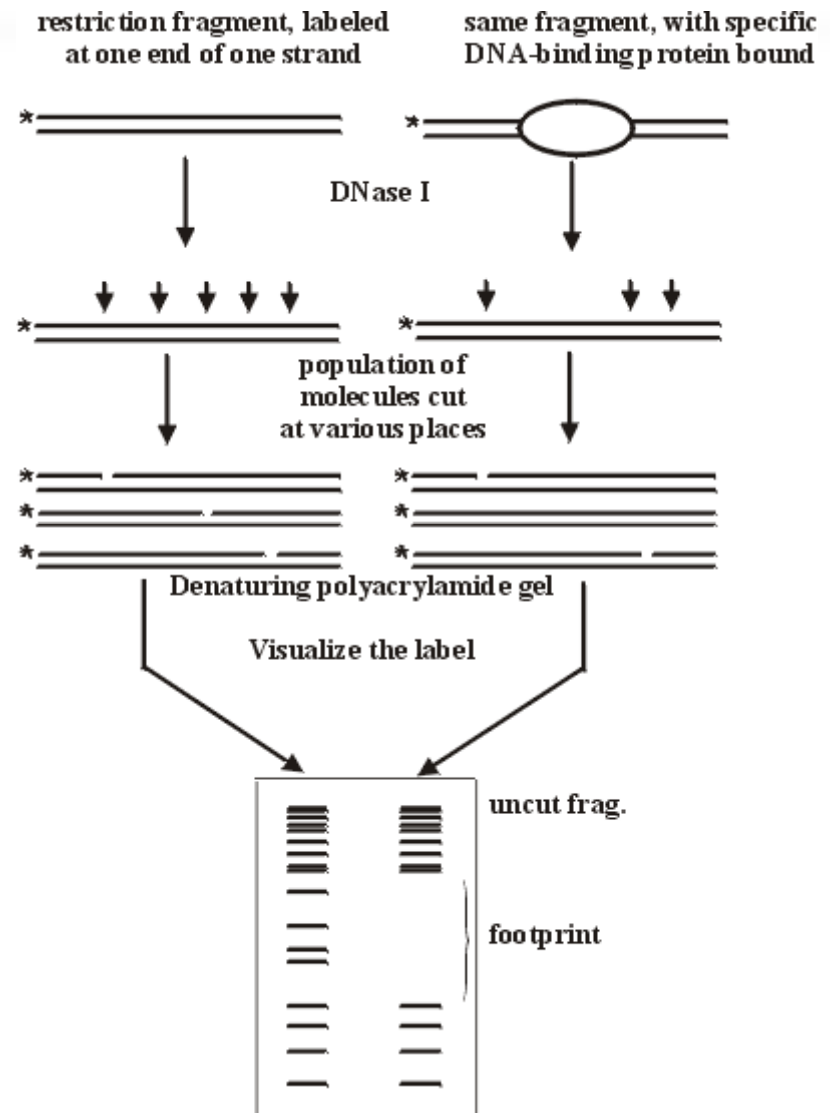
DNase I footprinting

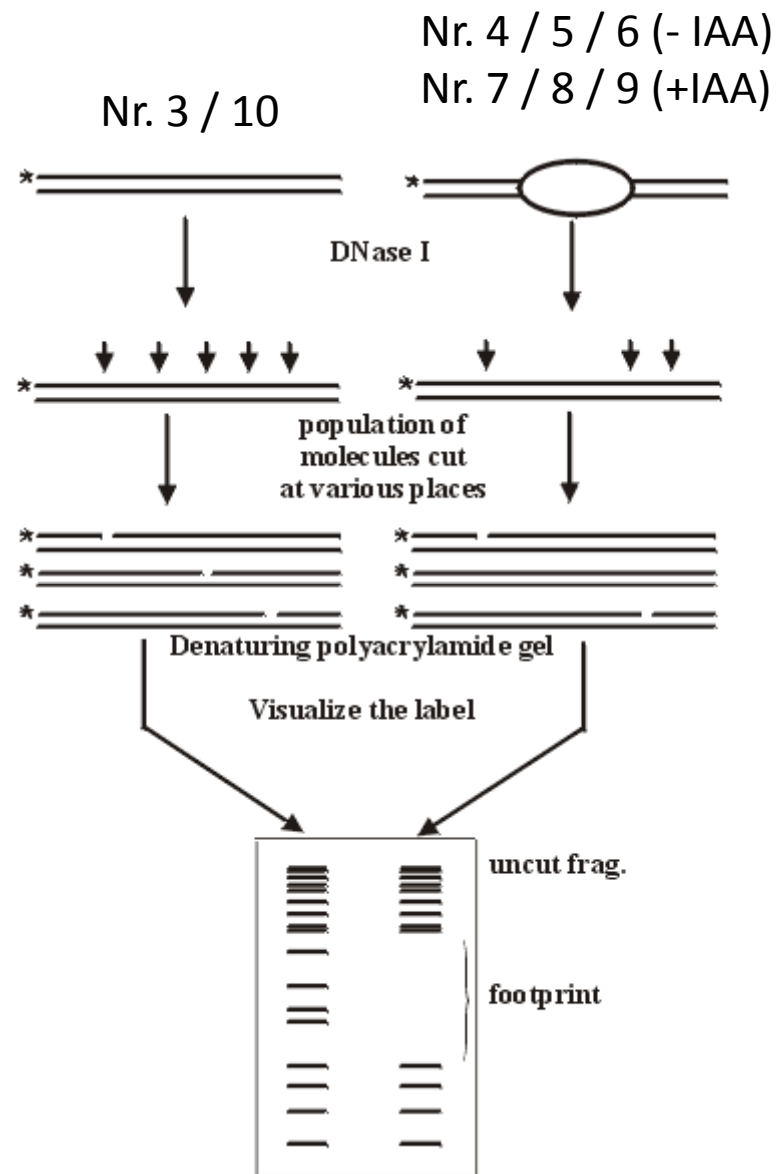
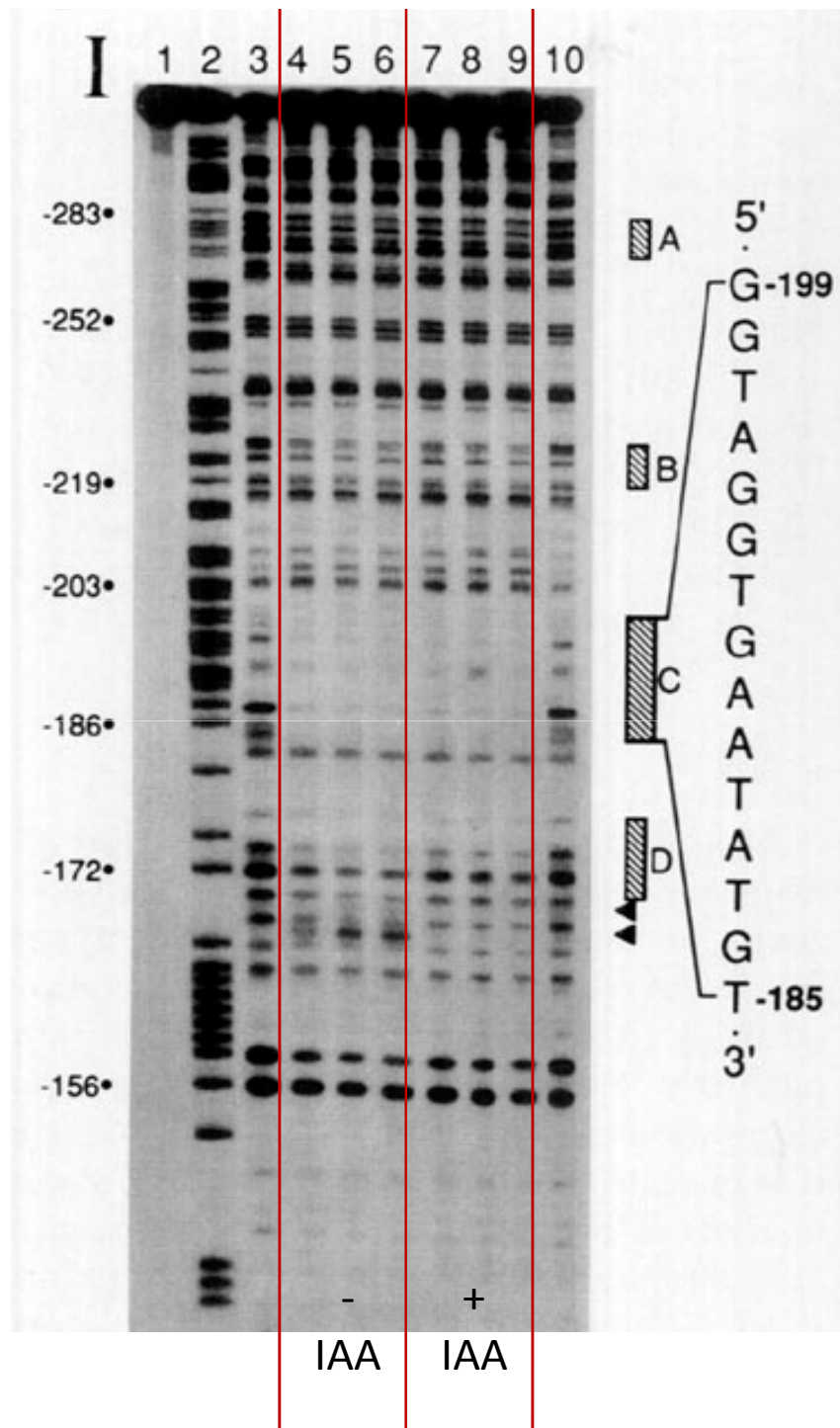
Bereich wurde auf 164 bp eingegrenzt (-318 bis -154)

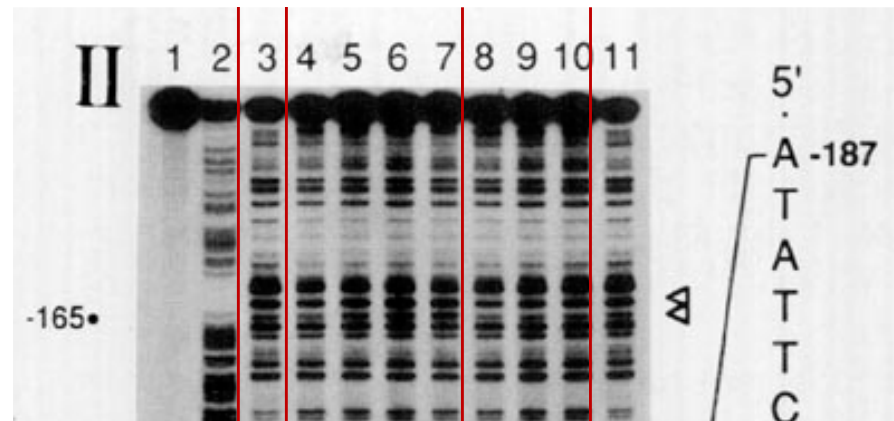
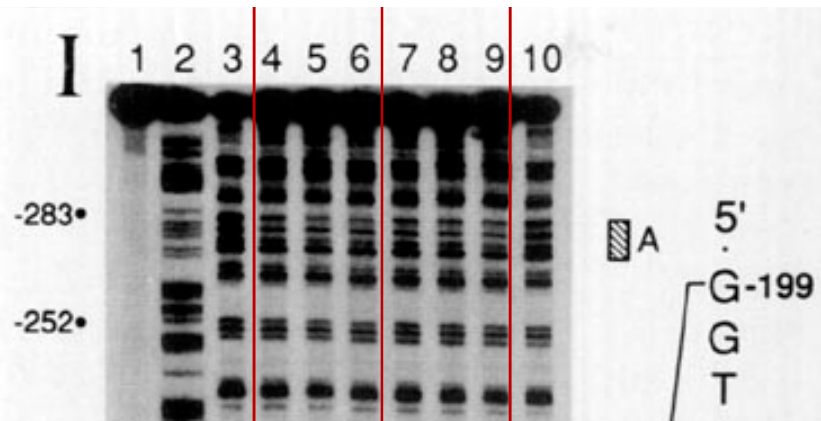
Liegen Bindestellen für kernlokalisierte Proteine (Transkriptionsfaktoren) in diesem Bereich?



DNase I footprinting







III

-318 -300 -280 A

GCTTTCCCATAACCAACTCACATAAGGGACCCTCCATTCACATGCTCATGTTTCC

CGTTTGGGTATTGGTTGAGTGTATTCCCTGGGAGGTAAGTGTACGAGTACAAAGG

-260 -240 B -220 ↓

TCAAATCAACGCTCAAGATTTCTGTTCTCAAACAATCTCAACCATCCAAATTCC

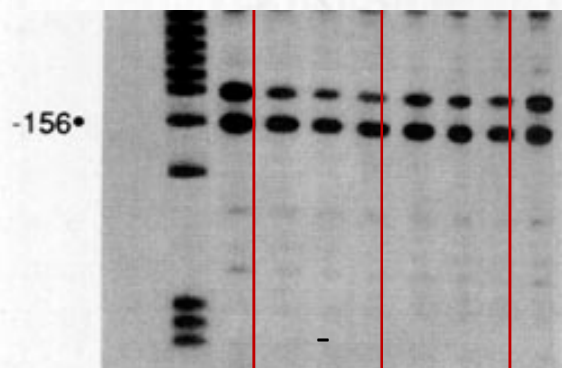
AGTTTTAGTTGCGAGTTCTAAAGCAAGAGTTTTGTTAGAGTTGGTAGGTTTAAGG

↓ ↓ ↓ -200 C -180 D -160

AGACCAAATGGTAGGTGAATATGTCCCATTCTTGTCACCCCTATAAGGAGACACC

TCTGGTTTACCATCCACTTATACAGGGTAAGAACAGTGGGGATATTCCTCTGTGG

E ↑ ↑ ↑ Δ Δ

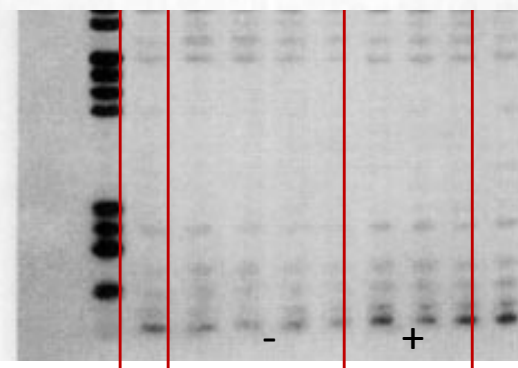


IAA

└ T -185
3'

komplementärer Strang

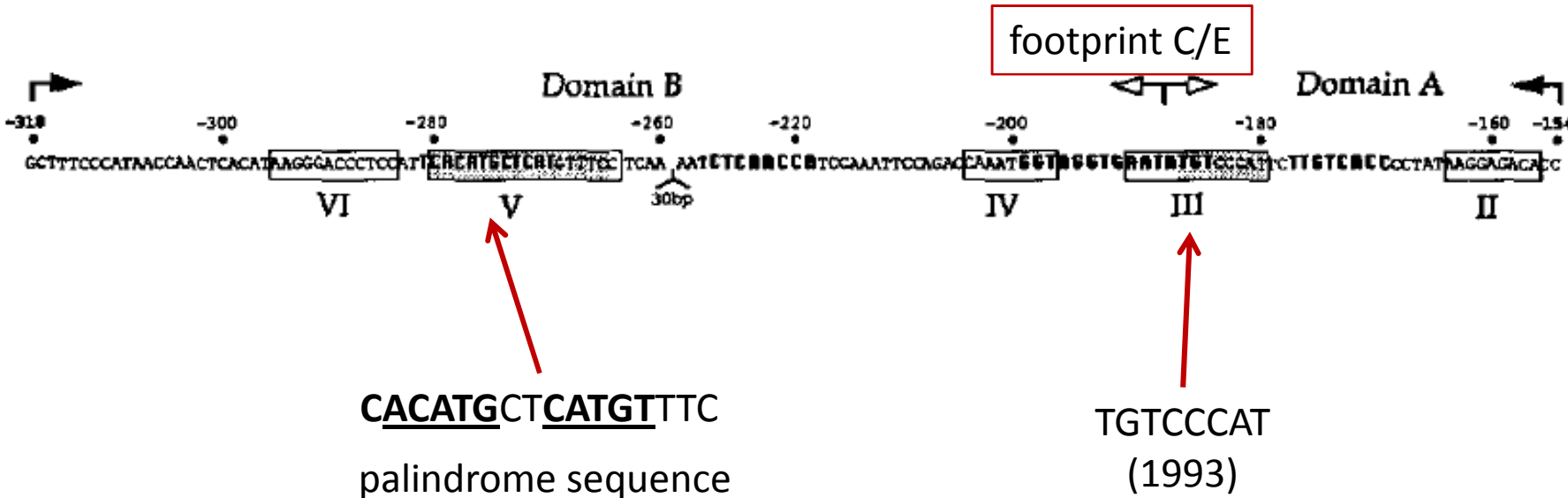
-239•
-249•



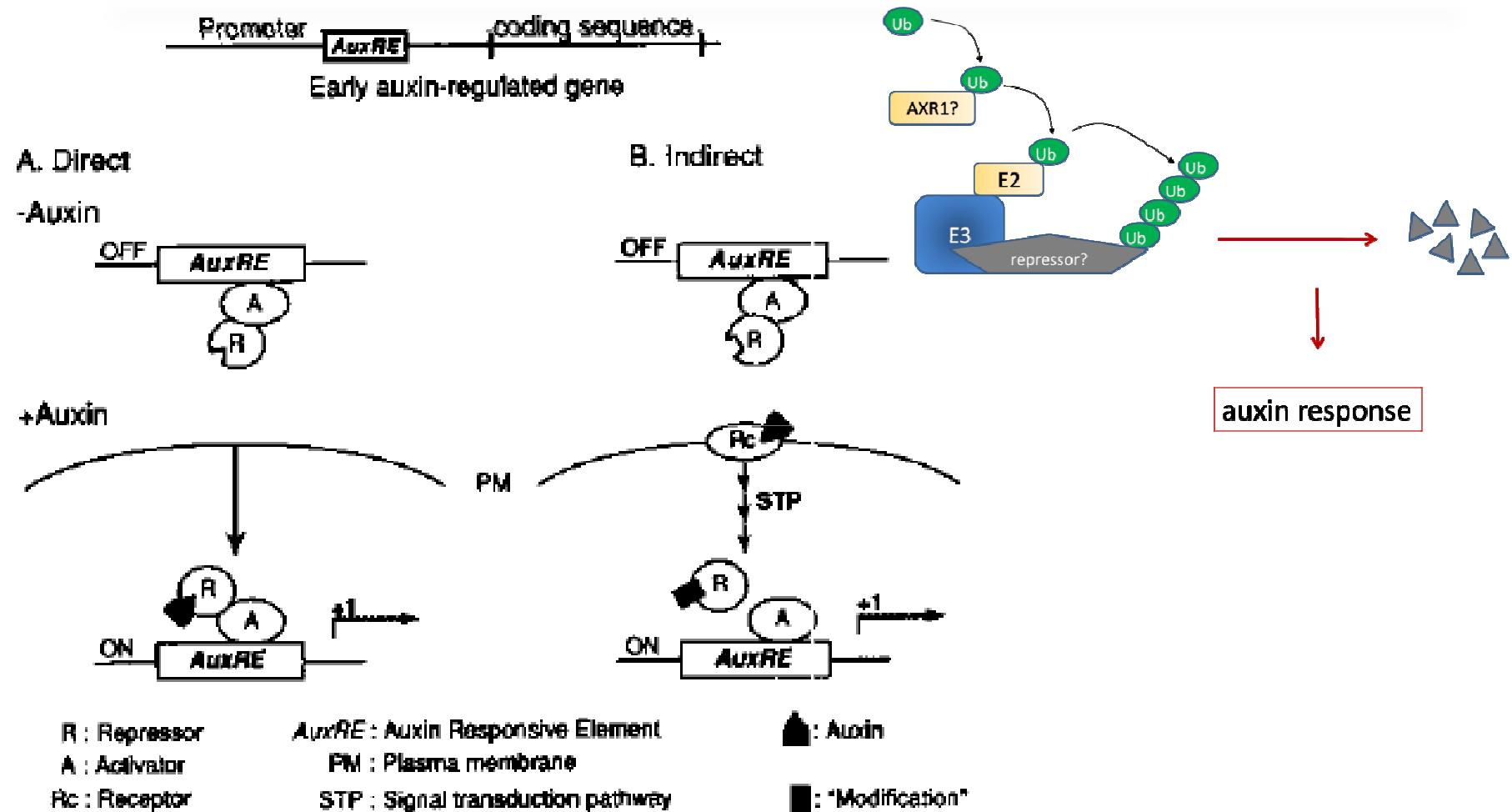
IAA

IAA

└ G -204
3'



Modelle (1993)



1. paper

J. Mol. Biol. (1993) 233, 580–596

**Identification of the Auxin-responsive Element, *AuxRE*, in the
Primary indoleacetic Acid-inducible Gene, *PS-IAA4/5*, of Pea
(*Pisum sativum*)**

Nurit Ballas†, Lu-Min Wong† and Athanasios Theologis‡

Fazit: Es konnten zwei verschiedene Sequenzbereiche identifiziert werden, die zusammen die Auxin response vermitteln. Für beide Bereiche konnte die Bindung von Kernproteinen gezeigt werden + konservierte Sequenzen gefunden werden die in Auxin-responsiven Genen verschiedener Arten auftreten

2.paper

Science (1997)

ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle*

Ziel: weitere Charakterisierung des AuxRE
Identifizierung von Proteinen, die mit AuxRE interagieren

Hintergrund:

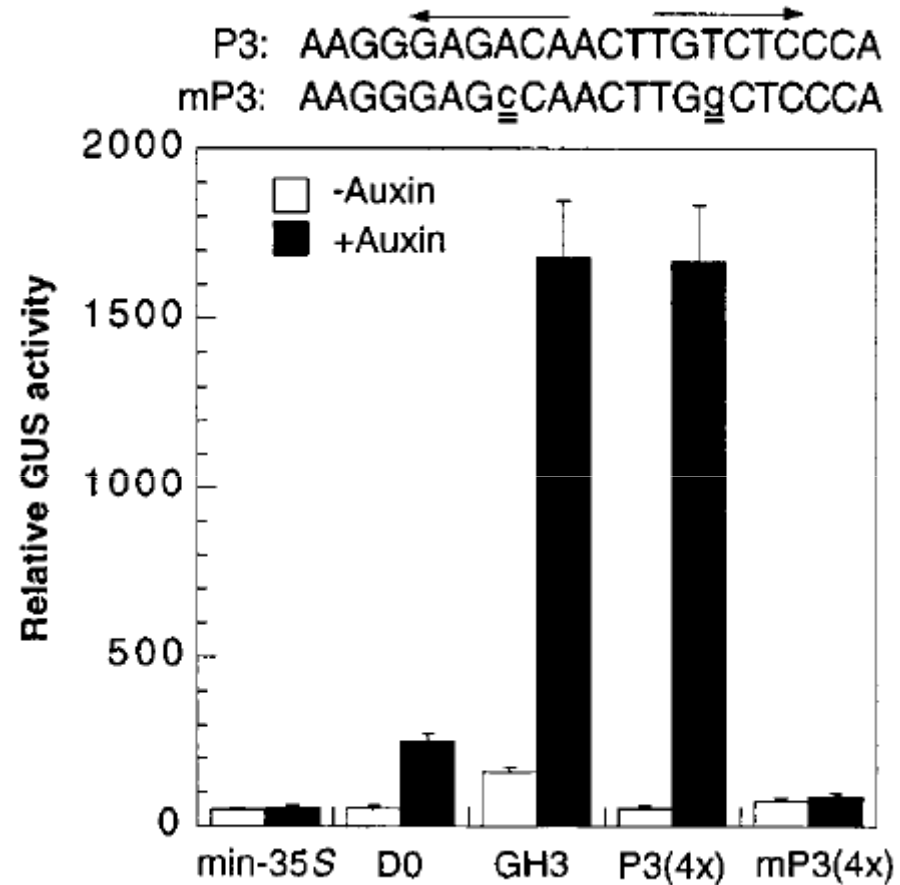
- AuxRE wurde anhand eines anderen Promotors (GH3 aus Sojabohne) als konservierte Sequenz TGTCTC identifiziert
- Motif weist Homologie zu Glucocorticoid Motif (TGTTCT) auf, das i.d.R. als Palindromsequenz (AGAACA_nTTGTTCT) vorliegt

➤ liegen AuxRE auch in Palindromen vor?

quantitativer GUS assay



fluorimetrische
Quantifizierung der
Blaufärbung



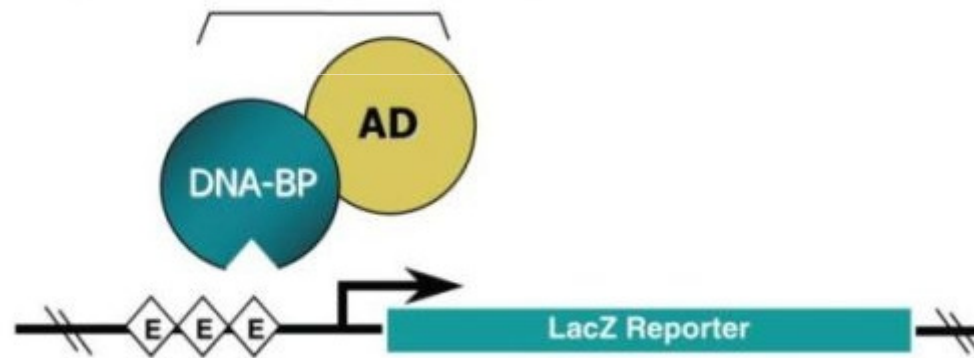
↑
D0: eins der zwei
AuxRE des GH3
Promotors

→ Test in
Möhren
Protoplasten

Yeast-one-hybrid system

Identifizierung von Proteinen, die an das AuxRE binden können

1. cDNA expression library (jeweiliges Protein wird mit einer Aktivierungsdomäne verbunden)
2. AuxRE wird mit einem LacZ reporter verbunden



bindet ein Protein (aus der cDNA expression library) an das AuxRE, kommt es zur Aktivierung der LacZ Expression und die entsprechenden Hefezellen werden je nach Reportergen blau oder können auf einem Minimalmedium wachsen auf dem ohne Expression des Reporters kein Wachstum möglich ist.

Yeast-one-hybrid screen

5 cDNA Klone wurden identifiziert – alle kodieren für das gleiche Protein: ARF1

A

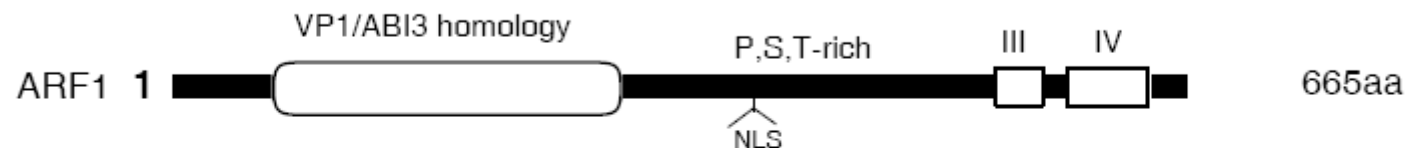
```
1  MAASNHSSGK PGGVLSDALC RELWHACAGP LVTLPREGER VYYPPEGHME
51  QLEASMHQGL EQQMPSFNLP SKILCKVINI QRRABPETDE VYAQITLLPE
101 LDQSEPTSPD APVQEPEKCT VHSFCKTLTA SDTSTHGGFS VLRRHADDCL
151 PPLDMSQOPP WOELVATDLH NSEWHFRHIF RGOPRRHLLT TGWSVVFVSSK
201 KLVAGDAFIF LRGENEELRV GVRHRMROOT NIPSSVISSH SMHIGVLATA
251 AHAIITGTIF SVFYKPRTSR SEFIVSVNRY LEAKTQKLSV GMRFKMRFEG
301 EEAPKRFSG TIVGVQENKS SVWHDSEWRS LKVQWDEPSS VFRPERVSPW
351 ELEPLVANST PSSQPQPPQR NKRPRPPGLP SPATGPSGPV TPDGVWKSPA
401 DTPSSVPLFS PPAKAATFGH GGNKSFGVSI GSAFWPTNAD SAAESFASAF
451 NNESTEKKQT NGNVCRLFGF ELVENNVNDE CFSAAVSIGA VAVDQPVPSN
501 EFDSGQQSEP LNINQSDIPS GSGDPEKSSL RSPQESQSRQ IRSCTKVHMQ
551 GSAVGRAIDL TRSECYEDLF KLEEMFDIK GELLESTKKW OVVYTDDDD
601 MMMVGDDPWN EFCGMVRKIF IYTPPEVKKL SPKNKLAVNA RMQLKADAE
651 NGNTEGRSSS MAGSR
```

→ Sequenzhomologie zu *VP1* (TF aus Mais) und *ABI1* (Homologes Gen in Arabidopsis)

→ mögliche NLS

→ Sequenzhomologie zu *AUX/IAAs* (putative TFs)

Struktur der Gene



alignments

B

ARF1	114	QEPEKCTVHSFCKTLTASDTSTHGGFSVLRRHADDCLPPLDMSQQPPWQELVATDLHNSE
AtEST	178	TTGFRSAEALFEKAVTPSDVGKLNRLVIPKHAEKHFPLPSSNVSVKGVLLNFEDVN-GK
ABI3	562	WKPEKNLRFLQKVLKQSDVGNLGRIVLPKKEAETHLPELEAR---DGISLAMEDIGTSR
VP1	507	AKADKNLRFLQKVLKQSDVGS LGRIVLPKKEAEVHLPELKTR---DGISIPMEDIGTSR

ARF1	174	-WHFRHIFR--GQPRRHLLTTGWSV FVSSKKLVAGDAFI FLRGENEELRVGVRRHMRQQT
AtEST	237	VWRFRYSYW--NSSQSYVLTKGWSRFVKEKNLRAGDVVSFSRSNGQDQQLYIGWKSRS GS
ABI3	619	VWNMRYRFPNPKSRMYLLENT-GDFVKTNGLQEGDFIVIYSDVKCGKYLIRGVKVRQPS
VP1	564	VWNMRYRFPNPKSRMYLLENT-GEFVRSNELQEGDFIVIYSDVKSGKYLIRGVKVRPPP

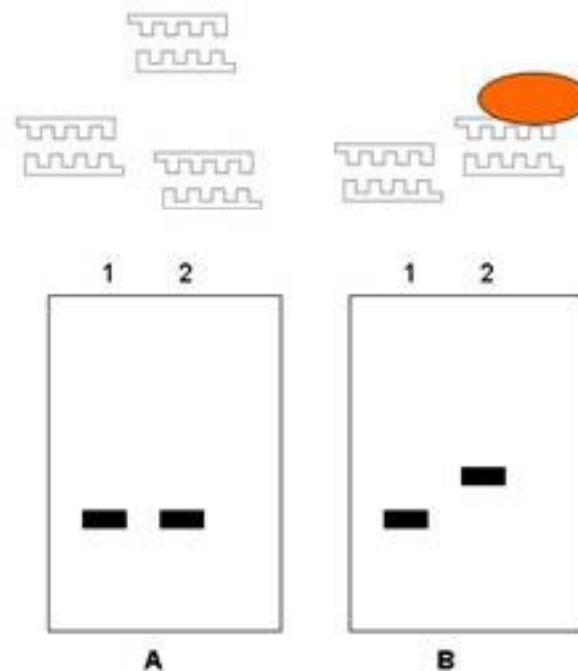
C

		"" "β"" "-----α-----" "-----α-----"
ARF1	544	CTKVHMQGS AVGRAIDLTRSECYEDL FKKLEEMF-----DIKGELLES-----
ARF1-BP	330	CTKVHKQGI ALGRSVDLSKFQNYEELVAELDRIF-----EFNGELMAP-----
IAA24	759	YTKVQKTGS-VGRSIDVTSFKDYEELKSAIECMF-----GLEGLLTHPQ-----
IAA13	130	FIKVMMDGVAIGRKVDLNAHSSYENLAQTLED MFRTNPGTVGLTSQFT-----KPLRLL
Aux28	125	FVKVSMDGAPYLRKVDLKMYKSYRELSDSL GKMFSSFTFGNC-ESQGMKDFM NESKLNDL
PsIAA4/5	94	FVKVSMDGAPYLRKIDLRVYGGYSELLKALETMF-KLTIGEYSEREGYKG-----
		----- box III -----
ARF1	587	--TKKWQVVYTDDEDDMMVGD DPWNEFCGMVRKIFIYTP EEVKKLSPKNKLAVNARMQ--
ARF1-BP	373	--KKDWLIVYTDDENDMMLVGDDPWQEFCCMVRKIFIYTK EEVRKMNP-GTLSCRSEEEA
IAA24	802	--SSGWKL VYVDYESDVL LVGDDPWEEFVGCVRCIRILSPTEVQQMSEEGMKLLNSAGIN
IAA13	185	DGSSEFVLTYEDKEGDWMLVGDPWRMFINSVKRLRVMKTSEANGLAARNQEPNERQRK-
Aux28	184	LNSSDYVPTYEDKDGDWMLVGDPWEMFVESCRLRIMKGKEAIGLGLAPRAMAKCKNR-
PsIAA4/5	143	---SEYAPTYEDKDGDWMLVGDPWD--VTSCRLRIMKGTEAKGLGCGV-----
		----- box IV -----

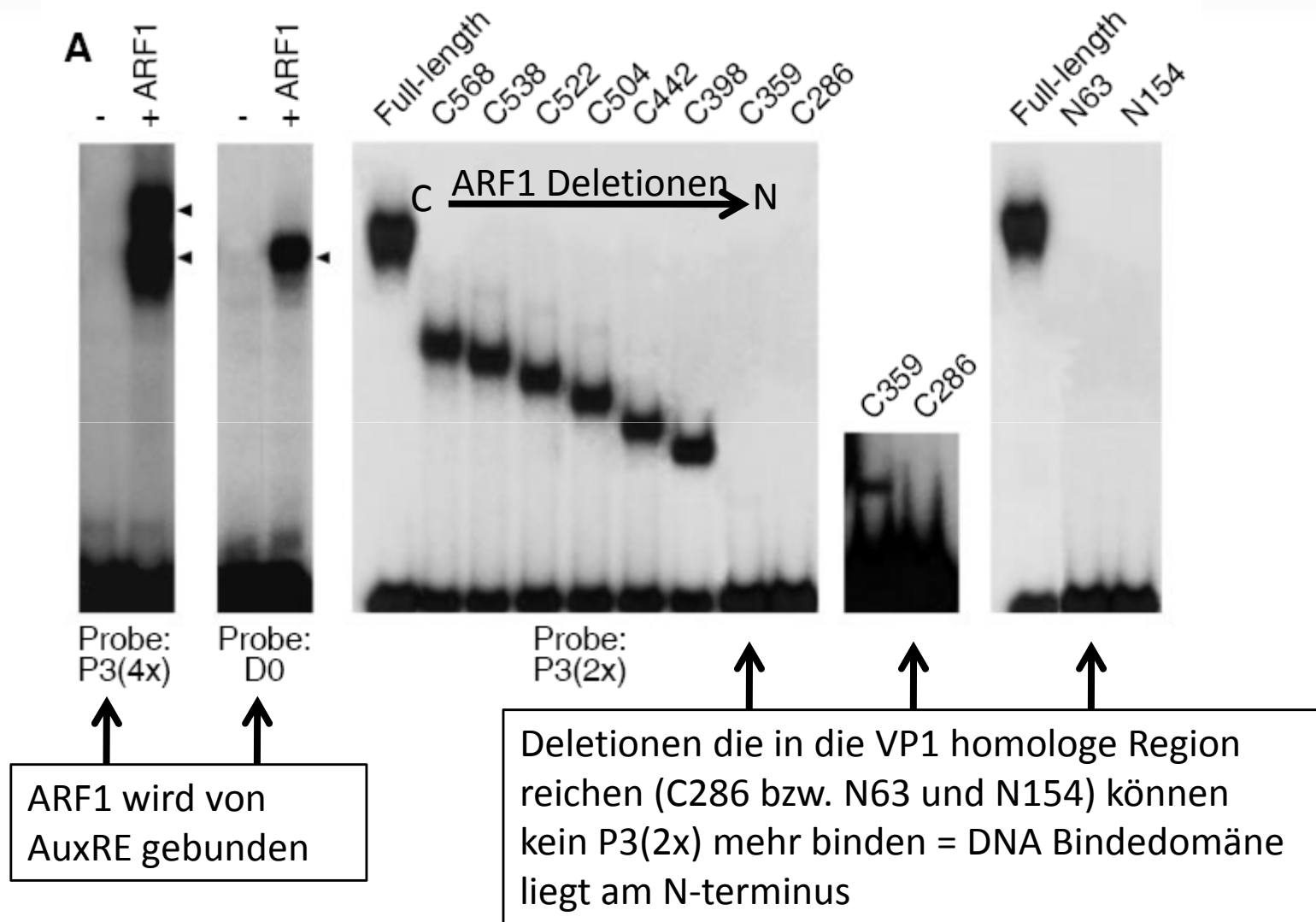
gel mobility shift assay

Nachweis der Bindung eines Proteins an DNA

DNA Fragmente an die ein Protein gebunden vorliegt, bewegen sich langsamer im Gel als freie DNA Stücke (abhängig von der Größe und Anzahl der gebundenen Proteine).



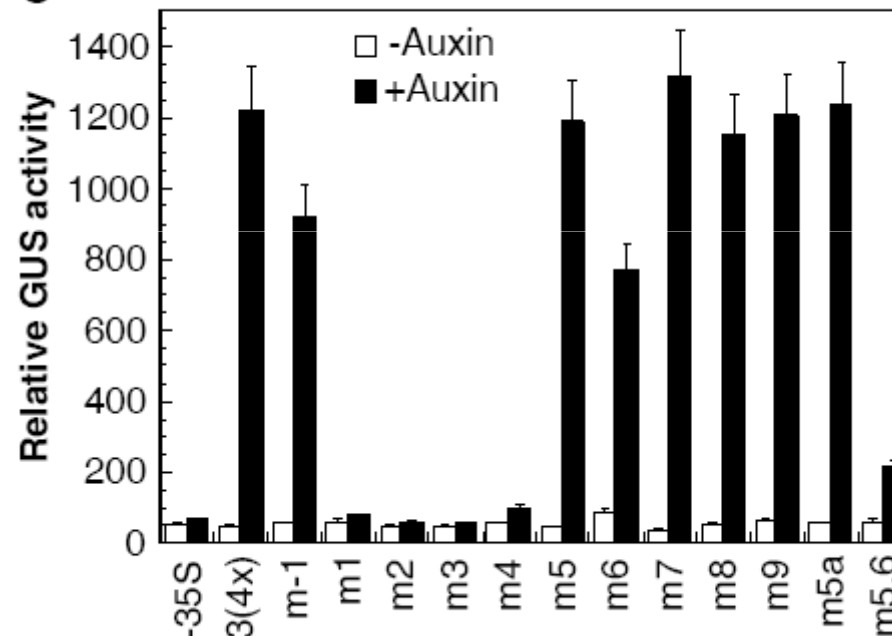
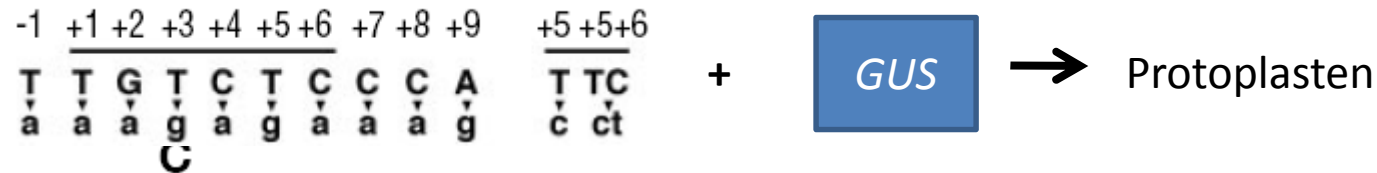
gel mobility shift assay





quantitativer GUS assay

Welche Basen im Motif sind essentiell für die Auxininduktion?

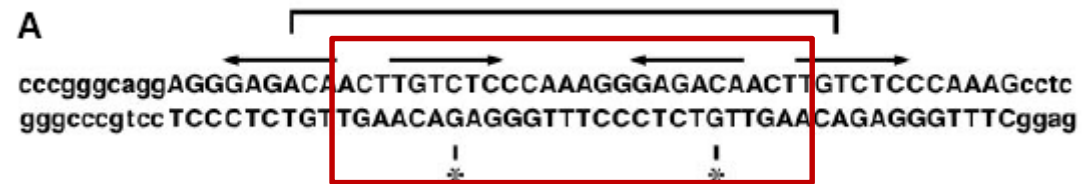
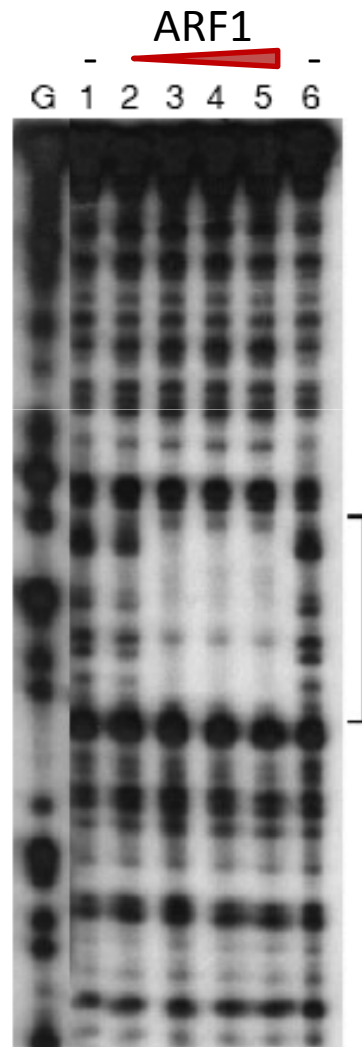


keine Auxininduktion der GUS Aktivität



Struktur der ARF1 Bindestelle

DNase I footprinting

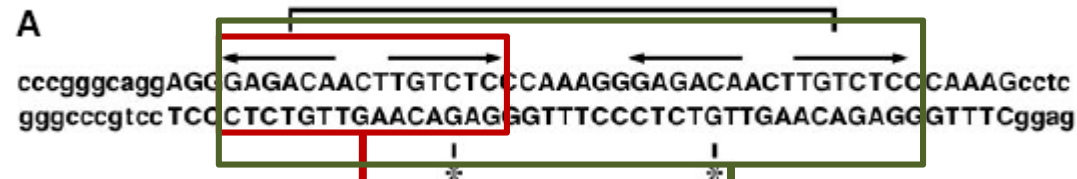


ARF1 bindet scheinbar bevorzugt an den everted repeat
Bereich der Palindromen AuxRE Sequenz



Test mit mobility shift assay

Struktur der ARF1 Bindestelle(n)

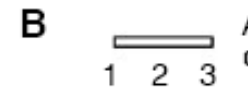


P3 (1x)

= 1 inverted repeat

P3 (2x)

= 2 inverted repeats
1 everted repeat



Probe — P3 —
(1x) (2x) (4x)

- 1 x IR ist nicht ausreichend für ARF1 Bindung
- 1 x ER kann ARF1 binden
- 2 x ER = 2 ARF1 Komplexe (P3(4x))

P3: AAGGGAGACAACTTGTCTCCA

Inverted repeat

ER7: CTTGTCTCCCAAAGGGAGACAA

Everted repeat

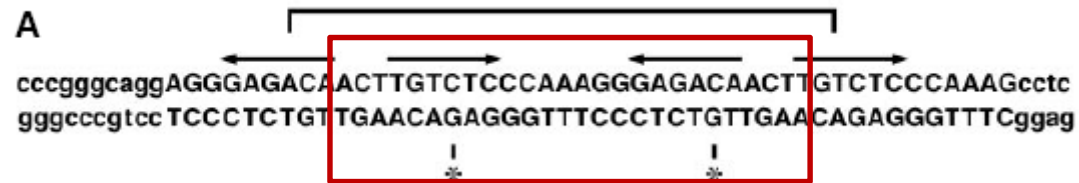
mER7: CTTGTCTCCCAAAGGGAGAA

ER9-IAA4/5: CTTGTCaCCCTATAAGGAGACAA

Ps/AA4/5, Domain A



Struktur der ARF1 Bindestelle



ARF1 bindet im everted repeat Bereich der Palindromen
AuxRE Sequenz



bei GREs ist der Abstand zwischen den Palindromen
wichtig für die Bindungsaffinität



Auch bei AuxREs?



quantitativer GUS assay

A

cccgggcaggAGGGAGACAACCTTGTCTCCCAAAGGGAGACAACCTTGTCTCCCAAAGcctc
gggcccgctc TCCCTCTGTTGAACAGAGGGTTTCCCTCTGTTGAACAGAGGGTTTCggag

Abstand
0 (ER0) – 9 (ER9)
Basen

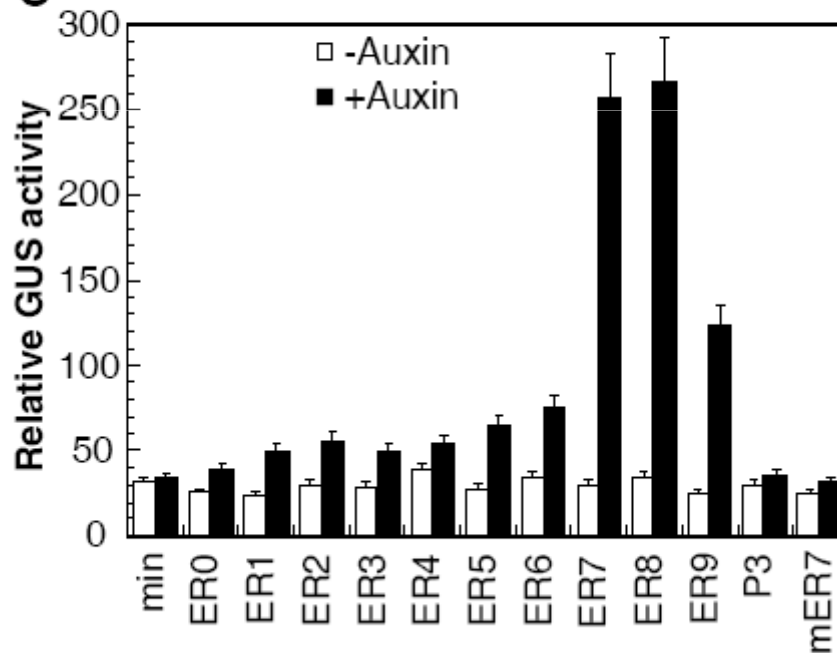
ER Konstrukte +

GUS



Protoplasten

C



Auxin response ist am stärksten,
wenn der Abstand der ERs 7 bis 8
Basen beträgt

ARF1 ▶



2.paper

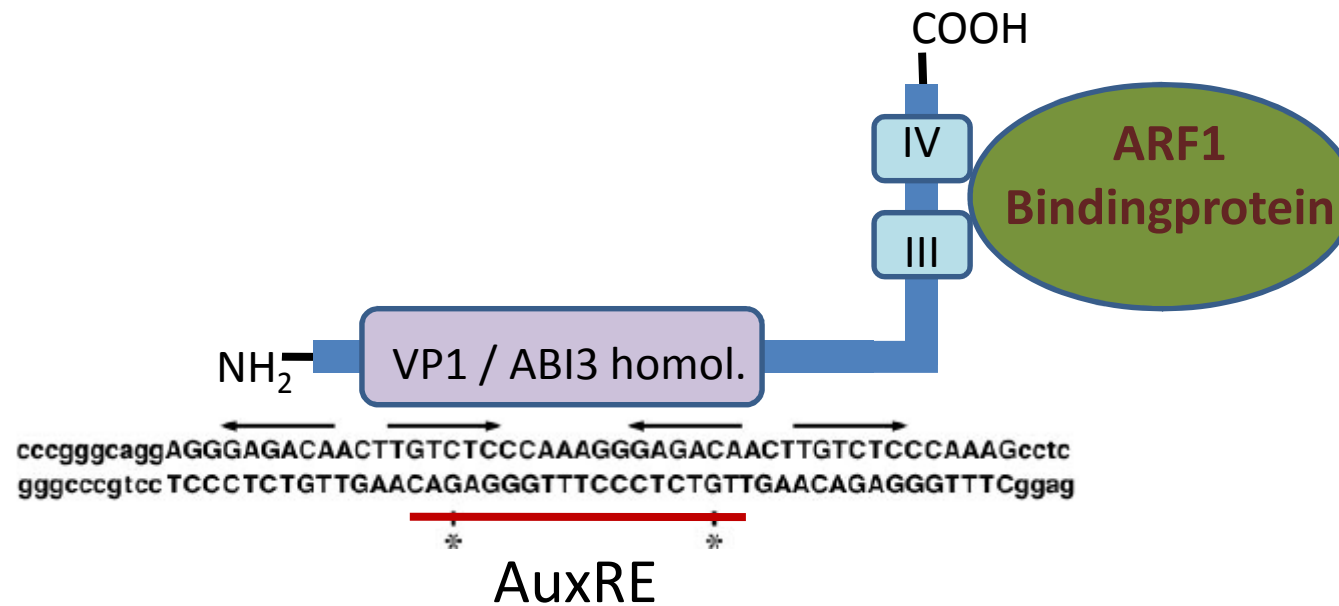
Science (1997)

ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements

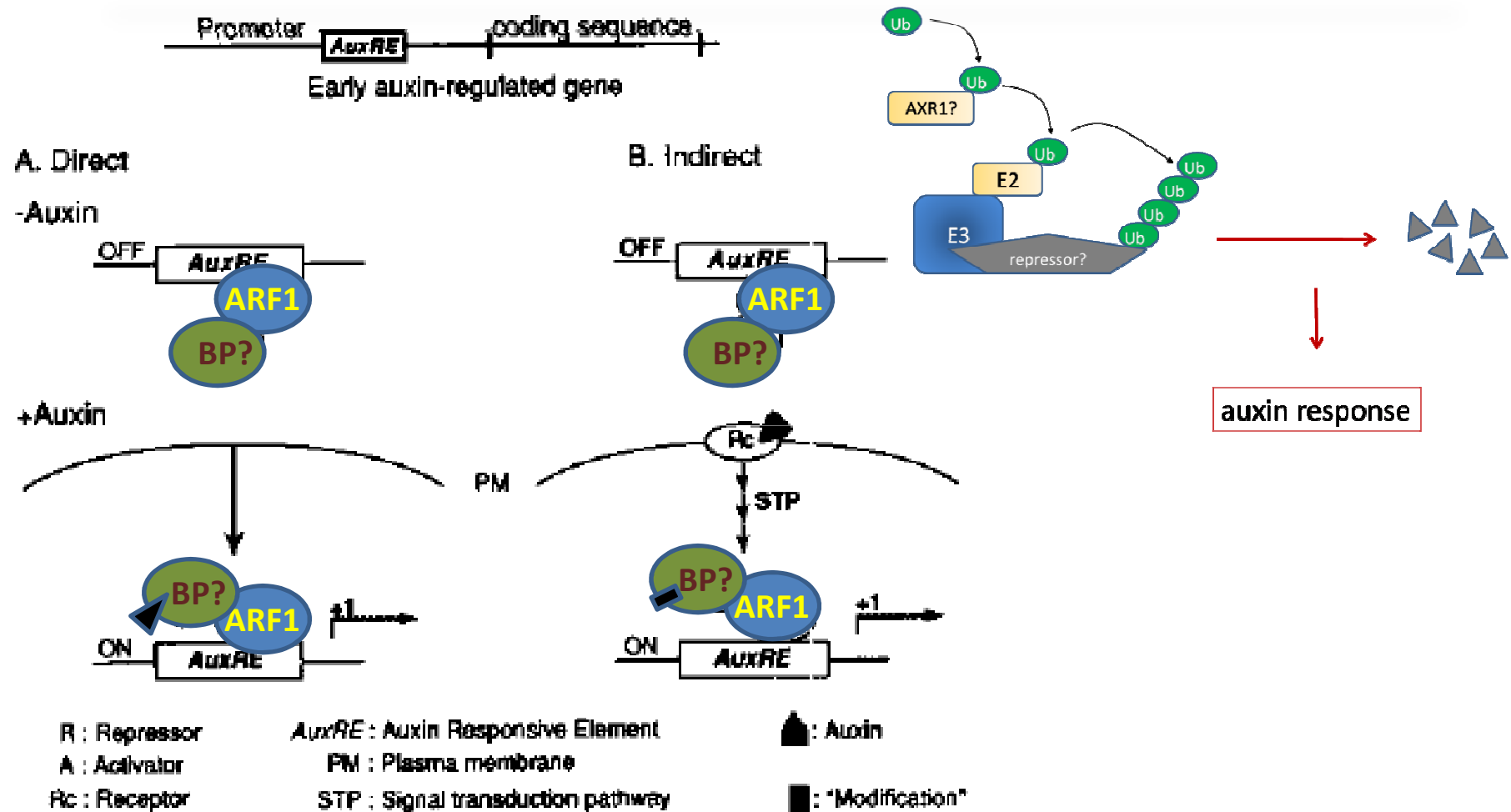
Tim Ulmasov, Gretchen Hagen, Tom J. Guilfoyle*

Fazit:

ARF1



Modelle (1997)





nächste Woche:

Alexandra und Ariane:

The Plant Journal (1999) 19(3), 309–319

Dimerization and DNA binding of auxin response factors

Tim Ulmasov[†] Gretchen Hagen and Tom J. Guilfoyle*

*Department of Biochemistry, 117 Schweitzer Hall,
University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA*